(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-512094
(P2021-512094A)
(43)公表日　令和3年5月13日(2021.5.13)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/352	(2006.01)	A61K	31/352	4C076
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10	4C086
A61K 9/20	(2006.01)	A61K	9/20	
A61K 9/14	(2006.01)	A61K	9/14	
A61K 9/48	(2006.01)	A61K	9/48	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 18 頁）　最終頁に続く

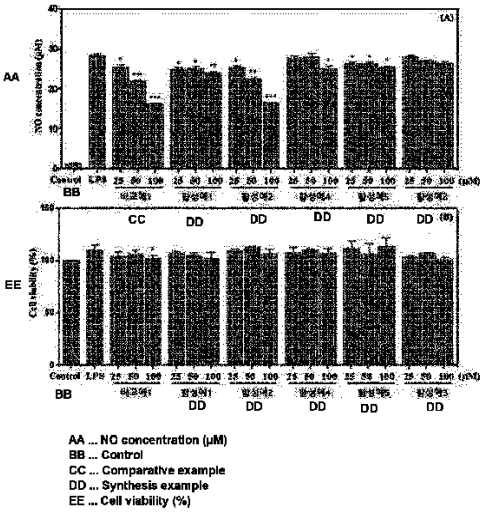
(21)出願番号　特願2020-541647 (P2020-541647)
(86)(22)出願日　平成31年1月28日 (2019.1.28)
(85)翻訳文提出日　令和2年9月8日 (2020.9.8)
(86)国際出願番号　PCT/KR2019/001158
(87)国際公開番号　WO2019/151732
(87)国際公開日　令和1年8月8日 (2019.8.8)
(31)優先権主張番号　10-2018-0012511
(32)優先日　平成30年1月31日 (2018.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国 (KR)

(71)出願人　519100468
フロントバイオ　インコーポレーテッド
ＦｒｏｎｔＢｉｏ　Ｉｎｃ．
大韓民国　カンウォン－ド　２４２３２、チュンチョン－シ、ソヤンカン－ロ、３２、＃１－４０５
(74)代理人　110000729
特許業務法人　ユニアス国際特許事務所
(72)発明者　イム、スン　ソン
大韓民国　２４２７８　カンウォン－ド、チュンチョン－シ、フソク－ロ、３２５、１０５－ドン　３０１－ホ、（フピョン－ドン、チュンチョン　ザ　シャープ　アパートメント）

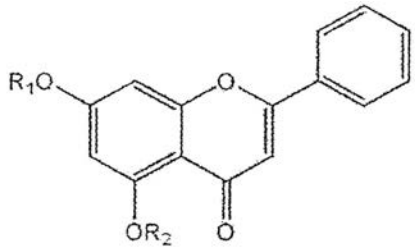
最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規なクリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物

(57)【要約】
本発明は、クリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物に関するものであり、より詳しくは、最終糖化産物（ＡＧＥ）の形成抑制効果を有して糖尿病合併症を予防または治療することができるクリシン誘導体化合物を有効成分として含む、糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物に関するものである。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記化学式１のクリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物：
【化１】



化学式１

上記化学式１において、
R_1はC_{1-4}アルキル、C_{1-6}アルケニルおよび－COR_3からなる群より選ばれ；
R_2はH、ハロゲン、C_{1-4}アルキルおよび－COR_4からなる群より選ばれ；
R_3およびR_4はそれぞれ独立してC_{1-4}アルキルである。
【請求項２】
R_1は－COR_3であり、R_2はH、－CH_3および－$COCH_3$からなる群より選ばれ、R_3はC_{1-4}アルキルであることを特徴とする、請求項１に記載の薬学組成物。
【請求項３】
R_1は－$COCH_3$であることを特徴とする、請求項２に記載の薬学組成物。
【請求項４】
上記化学式１の化合物が、下記化合物からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項１に記載の薬学組成物：
７－Ｏ－アセチルクリシン；
５，７－ジ－Ｏ－アセチルクリシン；
７－Ｏ－プレニルクリシン；
７－Ｏ－メトキシクリシン；および
５，７－ジ－Ｏ－メトキシクリシン。
【請求項５】
上記薬学組成物が、最終糖化産物（Advanced Glycation End products；ＡＧＥ）の形成を抑制させることを特徴とする、請求項１に記載の薬学組成物。
【請求項６】
上記糖尿病合併症が、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎臓病、糖尿病性心筋梗塞、糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障及び糖尿病性足部潰瘍からなる群より選ばれる１種以上であることを特徴とする、請求項１に記載の薬学組成物。
【請求項７】
請求項１に記載の薬学組成物を含む、薬学的製剤。
【請求項８】
上記薬学的製剤が、錠剤、丸剤、散剤、カプセル剤、シロップまたはエマルジョン状であることを特徴とする、請求項７に記載の薬学的製剤。
【請求項９】
上記薬学的製剤が、薬学的に許容可能な担体、補強剤および賦形剤からなる群より選ばれる１種以上を更に含むことを特徴とする、請求項７に記載の薬学的製剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規なクリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防また

は治療用薬学組成物に関するものであり、より詳しくは、優れた最終糖化産物（ＡＧＥ）の形成抑制効能を有して糖尿病合併症を予防または治療することができるクリシン誘導体化合物を有効成分として含む、糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

糖尿病（Diabetes Mellitus；ＤＭ）は、インスリン欠乏およびインスリン抵抗性又はこれらを両方とも特徴とし多くは肥満に関わる進行性疾患（progressive disease）である。空腹および食後の血糖上昇のため、失明、腎不全、心臓疾患、卒中（stroke）および切断（amputation）を引き起こす急性および慢性合併症（微細血管および大血管（micro- and macro-vascular））に患者がさらされる。血糖調節の改善がかかる糖尿病合併症の危険性を低めることが立証された。

【０００３】

このような疾患の進行的属性のため、血糖調節を維持するには進化した治療戦略が必要となる。２つの形態の糖尿病：第１型糖尿病、つまり小児糖尿病又はインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、および第２型糖尿病、つまり成人型糖尿病又はインスリン非依存性糖尿病（ＮＩＤＤＭ）がある。第１型糖尿病患者はインスリンを合成および分泌する膵臓β細胞の免疫学的破壊によりインスリンが絶対的に不足している。第２型糖尿病は病因がより複合的であり、相対的なインスリン欠乏、インスリン作用減少、およびインスリン抵抗性を特徴とする。早期発生ＮＩＤＤＭ又は若年発症成人型糖尿病（Maturity-Onset Diabetes of the Young；ＭＯＤＹ）は、中年に発病する最も一般的な形態のＮＩＤＤＭと多くの特性を共有する（Rotterら、1990）。明確なタイプの遺伝（常染色体優性）がＭＯＤＹで観察された。少なくとも、３つの全く相異なる突然変異がＭＯＤＹ家族から確認された（Bellら、1996）。

【０００４】

一方、糖尿病合併症は、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎臓病、糖尿病性心筋梗塞、糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障、糖尿病性血管合併症又は糖尿病性足部潰瘍を含み、主要原因はポリオール経路のアルドース還元酵素（aldose reductase）活性による過剰なソルビトール蓄積であると知られている。よって、アルドース還元酵素の抑制が糖尿病合併症の治療および予防において重要な役割を果たすことと知られている。今まで開発されたアルドース還元酵素抑制剤であるゾポルレスタット（zopolrestat）、ポナルレスタット（ponalrestat）、ソルビニル（sorbinil）、トルレスタット（tolrestat）、フィダレスタット（fidarestat）、ラニレスタット（ranireatat）及びエパルレスタット（epalrestat）等が様々な動物実験で糖尿病合併症を予防、遅延させると報告されている。

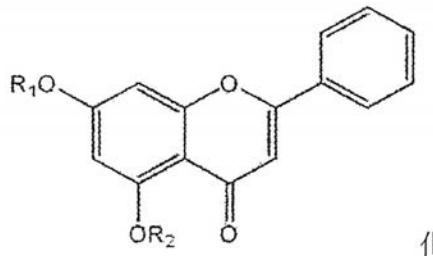
【０００５】

しかし、臨床でゾポルレスタット（zopolrestat）及びポナルレスタット（ponalrestat）の効能が低く、ソルビニル（sorbinil）の過敏反応、トルレスタット（tolrestat）の肝機能障害のような副作用により開発過程で中断された。現在日本と米国ではラニレスタット（ranireatat）及びフィダレスタット（fidarestat）の臨床実験が進んでいる。エパルレスタット（epalrestat）は米国食品医薬品局（ＦＤＡ）には承認されていないが、日本では１９９２年に承認されて市販されている。

【０００６】

また、ソルビトール蓄積はソルビトール脱水素酵素によって果糖に転換され、高濃度の果糖がタンパク質と結合して結局は最終糖化産物（Advanced Glycation End products；ＡＧＥ）の形成を加速化する。ここで、最終糖化産物は、生体組織と細胞を攻撃して老化を促進するだけでなく、糖尿、心臓疾患、癌などを含めて様々な疾患を誘発するに関与すると知られている。また、最終糖化産物が形成されると、血管壁やリンパ球などの細胞膜に最終糖化産物と結合可能な受容体（ＲＡＧＥ；Receptor of AGEs）が作られるが、最終糖化産物が受容体に結合すると、炎症に関連する各種免疫因子が活性化して慢性疾患を誘発又は悪化するようになる。

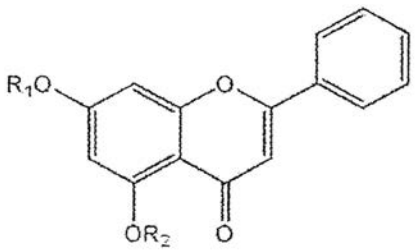
【０００７】
一方、クリシン（Chrysin）は、ポプラ（Populus nigra L.）の若葉、姫子松（五葉松）（Pinus parviflora Sieb. et Zucc.）の芯材又は配糖体トリンギンとしてCormus Tschonoski Maxim.（バラ科）の樹皮その他に含まれる。クリシンは通常抗酸化効果を有すると知られており、鎮痛剤などに使われる。
【０００８】
しかし、従来開示された技術では、本発明の新規なクリシン誘導体化合物を糖尿病合併症の予防又は治療に用いたことについて報告されたことがない。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
よって、本発明では糖尿病合併症の予防又は治療に有効な活性物質に対する研究を進めてきた。その結果、新規なクリシン誘導体化合物の場合に最終糖化産物の形成に対して抑制効果があることを確認した。従って、本発明の目的は、最終糖化産物の形成を抑制させることにより、糖尿病合併症の予防又は治療に使用可能な新規なクリシン誘導体化合物を含有する糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
上記目的を達成するために、本発明は下記化学式１のクリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物を提供する：
【００１１】
【化１】



化学式１

【００１２】
上記化学式１において、
R_1はC_{1-4}アルキル、C_{1-6}アルケニルおよび－COR_3からなる群より選ばれ；
R_2はH、ハロゲン、C_{1-4}アルキルおよび－COR_4からなる群より選ばれ；
R_3およびR_4はそれぞれ独立してC_{1-4}アルキルである。
【００１３】
本発明の他の具現例によると、上記の薬学組成物を含む薬学的製剤を提供する。
【発明の効果】
【００１４】
本発明で提供する新規なクリシン誘導体化合物は、最終糖化産物形成抑制効果を有し、糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物に有用である。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】本発明の一実施例であってＲＡＷ２６４．７細胞でクリシンとその誘導体がＮＯ生成（Ａ）と細胞生存（Ｂ）に及ぼす影響に関する結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
以下に列挙する定義は、本発明を記述するために用いられた様々な用語の定義である。これら定義は特に制限しない限り、個別的に又はこれらを含む用語の一部分として本明細書全体に適用される。

【００１７】
本明細書に用いられる用語「ハロゲン」は、他の言及がない限り、フッ素、塩素、臭素又はヨードを意味する。
【００１８】
本明細書に用いられる用語「アルキル」は、他の言及がない限り、C_nH_{2n+1}で表される飽和された、直鎖状又は分枝状の炭化水素基を示し、具体的にそれぞれ１乃至４つの炭素原子を含む飽和された、直鎖状又は分枝状の炭化水素基を示す。これらの基の例には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｔ－ブチル基が挙げられるが、これらに限らない。例えば、本明細書に用いられる用語「C_{1-4}アルキル」は、他の言及がない限り、炭素数１乃至４の直鎖状又は分枝状の炭化水素基を意味する。その例には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔ－ブチル基などがあるが、これらに限らない。
【００１９】
本明細書に用いられる用語「アルケニル」は、他の言及がない限り、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有する不飽和された、直鎖状又は分枝状の炭化水素残基（moiety）に由来する１価基を示し、具体的にそれぞれ２乃至６つの炭素原子を含む不飽和された、直鎖状又は分枝状の１価基を示す。これらの例にはエテニル基、プロペニル基、ブテニル基、１－メチル－２－ブテン－１－イル基が含まれるが、これらに限らない。
【００２０】
以下、本発明をより詳しく説明する。
【００２１】
本発明は、下記化学式１の新規なクリシン誘導体化合物およびその用途に関し、より詳しくは、クリシン誘導体化合物を活性成分として含有する糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物に関する。本発明の新規なクリシン誘導体化合物は、 優れた血糖調節および最終糖化産物（ＡＧＥ）の形成抑制効果を有し、糖尿病合併症を予防又は治療することができる。
【００２２】
具体的に、本発明の一具現例によると、下記化学式１のクリシン誘導体化合物を有効成分として含む糖尿病合併症の予防または治療用薬学組成物を提供する：
【化２】



化学式１

【００２３】
上記化学式１において、
R_1はC_{1-4}アルキル、C_{1-6}アルケニルおよび－COR_3からなる群より選ばれ；
R_2はH、ハロゲン、C_{1-4}アルキルおよび－COR_4からなる群より選ばれ；
R_3およびR_4はそれぞれ独立してC_{1-4}アルキルである。
【００２４】
本発明の他の具現例によると、上記化学式１で表される化合物においてR_1は－COR_3であり、R_2はH、－CH_3および－$COCH_3$からなる群より選ばれ、R_3はC_{1-4}アルキルであることを特徴とする薬学組成物を提供する。
【００２５】
本発明のまた他の具現例によると、上記化学式１で表される化合物においてR_1は－OCH_3であることを特徴とする薬学組成物を提供する。

【００２６】
本発明による上記化学式１の化合物の好ましい例は次の通りであるが、これに限るものではない：
【００２７】
７－Ｏ－アセチルクリシン；
５，７－ジ－Ｏ－アセチルクリシン；
７－Ｏ－プレニルクリシン；
７－Ｏ－メトキシクリシン；および
５，７－ジ－Ｏ－メトキシクリシン。
【００２８】
本発明の薬学組成物は、これに含まれる化学式１で表される化合物が最終糖化産物（ＡＧＥ）の形成を抑制することにより、これに関連する様々な疾患の予防又は治療にも有用である。
【００２９】
本発明の一具体例において、上記化合物が５，７－ジ－Ｏ－アセチルクリシンである場合、最終糖化産物の形成に対して優れた抑制効果を有する点で好ましいが、これに限るものではない。
【００３０】
本発明の一具体例において、上記糖尿病合併症は、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎臓病、糖尿病性心筋梗塞、糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障及び糖尿病性足部潰瘍からなる群より選ばれた１種以上であるが、これらに限らない。
【００３１】
本明細書で使われる用語「予防」とは、本発明の薬学組成物の投与によって糖尿病合併症を抑制したり発病を遅延させたりする行為のすべてを意味する。
【００３２】
本明細書で使われる用語「治療」とは、本発明の薬学組成物の投与によって糖尿病合併症による症状を好転又は改善させる行為のすべてを意味する。
【００３３】
本発明の他の具現例によると、上記の薬学組成物を含む薬学的製剤を提供する。
【００３４】
本発明の薬学的製剤は、錠剤、丸剤、散剤、カプセル剤、シロップまたはエマルジョンなどの様々な経口投与形態、または注射剤などの筋肉内、静脈内あるいは皮下投与のような非経口投与形態であってもよいが、好ましくは経口投与形態である。
【００３５】
また、上記薬学的製剤には、有効成分の他に通常の無毒性の薬学的に許容可能な添加剤として、具体的には担体、補強剤および賦形剤からなる群より選ばれた１種以上が添加され、通常の方法によって製剤化することができる。
【００３６】
本発明の薬学的製剤に使用可能な賦形剤としては、甘味剤、結合剤、溶解剤、溶解補助剤、湿潤剤、乳化剤、等張化剤、吸着剤、崩壊剤、酸化防止剤、防腐剤、滑沢剤、充填剤、芳香剤などが含まれるが、これらに限らない。例えば賦形剤として、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース、グリシン、シリカ、マグネシウムアルミノケイ酸塩、澱粉、ゼラチン、トラガカントゴム、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム（Sodium alginate）、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、水、エタノール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、オレンジエッセンス、ストロベリーエッセンス、バニラ香などが使用可能である。
【００３７】
本発明の薬学的製剤が経口投与形態である場合、使用される担体の例にはセルロース、ケイ酸カルシウム、トウモロコシ澱粉、ラクトース、スクロース、デキストロース、リン

酸カルシウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ゼラチン、タルクなどが挙げられるが、これらに限らない。

【００３８】

本発明の薬学的製剤が注射剤形態である場合、上記担体としては、水、食塩水、ブドウ糖水溶液、類似糖水溶液、アルコール、グリコール、エーテル、オイル、脂肪酸、脂肪酸エステル、グリセリドなどが挙げられるが、これらに限らない。

【００３９】

本発明による化合物を薬剤として使用するために、後者を製薬製剤の形態に製造し、これは経口又は非経口投与用活性成分以外に、適した製薬上有機または無機の不活性担体物質、例えば、水、ゼラチン、アラビアゴム、ラクトース、澱粉、植物性オイル、ポリアルキレングリコールなどを含有する。製薬製剤は、固体状、例えば錠剤、糖衣錠、坐剤あるいはカプセル剤、または液体状、例えば液剤、懸濁剤あるいは乳剤として存在し得る。また、これらは任意に補助剤、例えば、防腐剤、安定化剤、湿潤剤あるいは乳化剤；浸透圧変更用塩または緩衝剤を含有する。

【００４０】

非経口投与用としては、特に注射液剤または懸濁剤が好ましい。

【００４１】

担体システムとして、界面活性補助剤、例えば、胆汁酸塩又は動物あるいは植物リン脂質、又はこれらの混合物、およびリポソームやその成分を使用することができる。

【００４２】

経口投与用としては、特に滑石および／又は炭化水素ビヒクルあるいは結合剤、例えば、ラクトース、トウモロコシ又はジャガイモ澱粉を含有する錠剤、糖衣錠またはカプセル剤が好適である。また、液体状、例えば、甘味剤を加えたジュースを投与してもよい。

【００４３】

また、本発明による上記化学式１の化合物の人体投与用量は一般的に体重７０ｋｇの成人患者を基準とする場合、０．１ｍｇ／日乃至２，０００ｍｇ／日の範囲であるのが好ましい。本発明による化合物は１日１回から数回に分割投与できる。但し、上記の投与容量は患者の健康状態、年齢、体重および性別や、投与形態と疾患程度に応じて異なり、これゆえ本発明の範疇は上記提示した投与容量に限定するものではない。

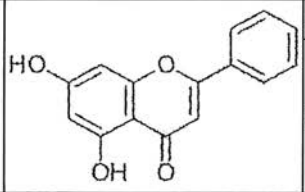
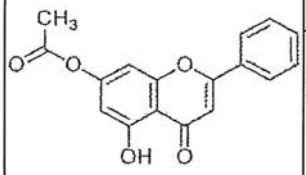
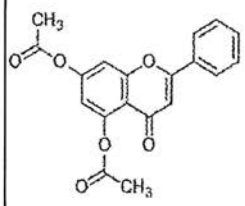
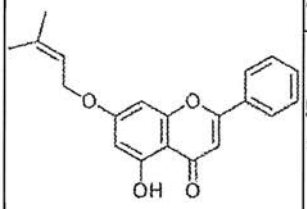
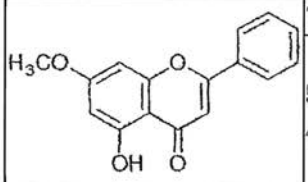
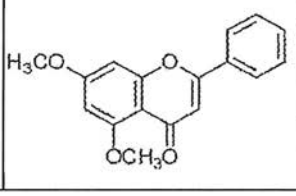
【実施例】

【００４４】

以下、本発明を下記の製造例および実施例に基づいてより詳しく説明するが、これは本発明を例示するものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【００４５】

【表１】

区分	化学構造	一般名 IUPAC名
比較例１		クリシン 5,7-ジヒドロキシ-2-フェニル-4H-クロメン-4-オン
合成例１		7-*O*-アセチルクリシン 5-ヒドロキシ-4-オキソ-2-フェニル-4H-クロメン-7-イル アセテート
合成例２		5,7-ジ-*O*-アセチルクリシン 4-オキソ-2-フェニル-4H-クロメン-5,7-ジイル ジアセテート
合成例３		7-*O*-プレニルクリシン 5-ヒドロキシ-7-（（3-メチル-2-ブテン-1-イル）オキシ）-2-フェニル-4H-クロメン-4-オン
合成例４		7-*O*-メトキシクリシン 5-ヒドロキシ-7-メトキシ-2-フェニル-4H-クロメン-4-オン
合成例５		5,7-ジ-*O*-メトキシクリシン 5,7-ジメトキシ-2-フェニル-4H-クロメン-4-オン

【００４６】

〔合成例１及び２〕７－Ｏ－アセチルクリシンおよび５，７－ジ－Ｏ－アセチルクリシンの合成

無水酢酸（１０ｍＭ）をピリジン５０ｍＬ及びクリシン（１０ｍＭ）を含む溶液に滴下した。室温で撹拌しながら２時間反応させた後、４０℃で溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。

【００４７】

残留物を塩化メチレン（ＭＣ）に溶解させ１Ｍ　ＨＣｌで３回洗浄した後、飽和重炭酸ナトリウム溶液および水で中和した。有機相を分離し、$MgSO_4$上で乾燥した上で真空で濃縮した。残留物をＭＣ／ＭｅＯＨ（１０：０乃至９．５：１．５、ｖ／ｖ）で溶出させて７－Ｏ－アセチルクリシン（７－ＯＡ）および５，７－ジ－Ｏ－アセチルクリシンを得た。

【００４８】

〔合成例３〕７－Ｏ－プレニルクリシンの合成

無水アセトン（７０ｍＬ）にクリシン（１０ｍＭ）、プレニルブロミド（２．２ｍＭ）および無水K_2CO_3（３．７ｍＭ）を添加した後、混合物を６５℃で８時間還流させた。

【００４９】

＊混合物溶媒をロータリーエバポレーターで４０℃で除去した。残留物をエチルアセテートに溶解させた後、ヘキサン／エチルアセテート（９：１：２：１、ｖ／ｖ）でシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して７－Ｏ－プレニルクリシンを得た。

【００５０】

〔合成例４及び５〕７－Ｏ－メトキシクリシンおよび５，７－ジ－Ｏ－メトキシクリシンの合成

８０ｍＬのＤＭＣ（Dimethyl Carbonate）中に２．５４ｇのクリシン（０．５ｍｍｏｌ）と１．８４ｇの１，８－ジアザビシクロ（５．４．０）ウンデカ－７－エン（1,8-Diazabicyclo（5.4.0）undec-7-ene）を混合し９０℃で１９時間反応を進めた。

【００５１】

反応物にメタノール（２４０ｍｌ）を入れて濃縮した後、その濃縮物にエチルアセテート（２００ｍｌ）と１Ｎ　ＨＣｌ（１００ｍｌ）を入れて分画を実施した。

【００５２】

有機分画層（Ethyl acetate）を濃縮してＮａＣｌで中和した上、Na_2SO_4で脱水してシリカゲルカラムを行い、７－Ｏ－メトキシクリシンと５，７－ジ－Ｏ－メトキシクリシンを分離した。

【００５３】

［実験例１］

（１）アマドリ化合物（amadori compound）形成に対するヘモグロビン－δ－グルコノラクトン分析（初期段階）

タンパク質糖化の初期段階の評価は、δ－グルコノラクトン分析法（Rahbar et al., 1999）によって決定された。簡単に言えば、３７℃で７日間滅菌された暗条件の下で０．２ｇ／Ｌ　NaN_3を含有するリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．４）で新しいヒト血液（５０ｍｇ／ｍＬ）をブドウ糖（１４４ｍｇ／ｍＬ）とともに培養した。

【００５４】

いくつかの実験で、指示されたサンプルを０．０１～１ｍＭ濃度範囲でモデルシステムに添加した。サンプルの蛍光は３５５ｎｍおよび４６０ｎｍの励起および蛍光極大でそれぞれ測定された。アミノグアニジン（Aminoguanidine）は陽性対照群で公知の抑制剤として試験した。

【００５５】

（２）ＡＧＥ形成に対するウシ血清アルブミン－メチルグリオキサール分析（中間段階）

様々な濃度の化合物（対照群を含む）の存在下でウシ血清アルブミン（５０ｍｇ／ｍＬ）をリン酸ナトリウム緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．４）中メチルグリオキサール（１００ｍＭ）とともに３７℃で２４時間恒温培養した。

【００５６】

サンプルを溶解させるために用いられたジメチルスルホキシドは反応に影響を及ぼさないことと判明された。全ての試薬およびサンプルを０．２ｍｍメンブレンフィルターを通してろ過し滅菌した。蛍光強度はルミネセンススペクトロメータ（Luminescence spectrometer）ＬＳ５０Ｂ（Perkin-Elmer Ltd., Buckinghamshire, England）（Wu & Yen, 2005）を用いて３５５ｎｍの励起波長および４６０ｎｍの放出波長で測定した。アミノグアニジンは陽性対照群で試験した。５０％阻害活性（IC_{50}）を示す各試験試料の濃度は、残留活性に対してプロットされた対数濃度の最小２乗回帰線から推定された。

【００５７】

（３）ＡＧＥｓ架橋結合に対するＮ－アセチル－グリシル－リシン－メチルエステルＤ－リボース検定（後期段階）

この試験はRahbar等（1999）によって記述された方法を用いてＤ－リボースの存在下でＧＫペプチドの架橋結合を阻害するサンプルの能力を評価するに使われた。ＧＫペプチド（２６．７ｍｇ／ｍＬ）をリン酸ナトリウム緩衝液（０．５Ｍ、ｐＨ７．４）中Ｄ－リボース（２００ｍｇ／ｍＬ）と３７℃で２４時間無菌条件の下で培養した。合成された化合物を１０ｍＭおよび５０ｍＭで使われたアミノグアニジンを除いて１ｍＭの最終濃度でモデルシステムに添加した。培養期間の終期に、蛍光強度は３３５ｎｍの励起波長および４６０ｎｍの放出波長で測定された。

【００５８】

［実験例１の結果］

各段階におけるクリシン誘導体の最終糖化産物の形成抑制効果は［表２］の通りである。

【００５９】

【表２】

区分	ＩＣ$_{50}$（μＭ）		
	初期段階	中間段階	後期段階
比較例１	17.41	24.96	NI
合成例１	23.54	21.61	＞200
合成例２	0.26	0.91	22.33
合成例３	NI	＞200	＞200
合成例４	NI	＞200	NI
合成例５	7.88	41.78	39.88
陽性対照群（アミノグアニジン）	109.74	136.79	1902.67

【００６０】

（１）初期段階の結果：アマドリ化合物形成に対するクリシン誘導体の抑制効果

アマドリ化合物形成を抑制するためにクリシンとその誘導体の能力を比較した 結果、合成例１と合成例５の初期抑制活性は陽性対照群に比べてそれぞれ４．６６倍、１３．９２倍高かった。合成例２はアマドリ化合物形成に対する最も強力な抑制活性を示したが、これはクリシンおよび陽性対照群よりも６６．９６倍および４２２．０７倍も高かった。合成例２は０．００２５～０．０５μｇ／ｍＬで１．７６～５５．１３％の容量依存的阻害率を示した。

【００６１】

（２）中間段階の結果：クリシン誘導体のＡＧＥ形成抑制効果

クリシンおよび誘導体の抑制活性をＡＧＥ形成に対して分析しその結果を表２に示した。ＡＧＥ抑制剤アミノグアニジン（ＩＣ$_{50}$＝１３６．７９μＭ）を陽性対照群に用い、クリシンは陽性対照群より５．４８倍高い活性を示した。

【００６２】

試験化合物のうち合成例１、合成例２及び合成例５はＩＣ$_{50}$値がそれぞれ２１．６１、０．９１及び４１．７８μＭの強い活性を示した。特に合成例２は０．０５～０．５μｇ／ｍＬの低濃度で６．７９～９３．４２％の阻害活性を示した。

【００６３】

（３）後期段階の結果：クリシン誘導体のＡＧＥ架橋結合抑制効果

表２に示されているように、合成例２および合成例５はＡＧＥ架橋結合に対して有意の抑制活性を示した。合成例２および合成例５はそれぞれ２２．３３および３９．８８μＭのＩＣ$_{50}$値を示したが、陽性対照群は低いＩＣ$_{50}$値（１９０２．６７μＭ）を示した。

【００６４】

同様に、合成例２および合成例５はＡＧＥ形成の３段階でＩＣ$_{50}$値が低いために潜在的なＡＧＥ抑制剤としてみなされ得る。一方、クリシンは１０．０ｍｇ／ｍＬの濃度で抑制活性を示さなかった。

【００６５】
［実験例２：ＲＡＷ２６４．７細胞でＮＯ生成および細胞生存率の測定］
ＲＡＷ２６４．７細胞でクリシンおよび誘導体の細胞毒性をＭＴＳ分析キットを用いて調べた。細胞（１．６×１０^{4}／ウェル）を９６－ウェルプレートで培養し、サンプル（１０、２５および１００μＭ）を１２、２４、４８および７２時間処理した。培養後、ＭＴＳ溶液２０μＬ／ウェルを加湿５％CO_2大気で３７℃で９０分間培養した。ＥＬ－８００ユニバーサルマイクロプレートリーダー（Universal microplate reader）（Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, USA）を用いて４９０ｎｍでの光学密度を３回測定した。治療されていないグループの細胞生存率は１００％と設定された。ＲＡＷ２６４．７細胞を４×１０^{5}細胞／ウェルで１２－ウェルプレートに播種（ｓｅｅｄｉｎｇ）し、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）および２４時間様々な濃度のサンプルに培養した。培地中の酸化窒素（ＮＯ）濃度は、製造者が記述したグリスト試薬システムを用いて測定した。ＥＬ－８００ユニバーサルマイクロプレートリーダー（Ｂｉｏ－Ｔｅｋ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｉｎｃ．，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＵＳＡ）を用いて５７０ｎｍでＮＯの生成を測定し亜硝酸塩標準検量線［２１］と比較した。

【００６６】
［実験例２の結果］
ＲＡＷ２６４．７細胞に対するクリシン誘導体の抗炎症効果の結果は図１の通りである。

【００６７】
ＲＡＷ２６４．７細胞でＬＰＳ－誘導された炎症に対するクリシンおよびその誘導体の影響を調べ、細胞炎症の程度を示すバイオマーカーとしてＮＯ濃度を用いた。図１の（Ａ）はＬＰＳ－誘導されたＲＡＷ２６４．７細胞でＮＯ生成に対する比較例１、合成例１、合成例２、合成例４および合成例５の効果を示す。また、合成例２の処理はＬＰＳ－誘発ＲＡＷ２６４．７細胞で濃度依存的にＮＯを抑制し、その効果は比較例１と類似していた。ＲＡＷ２６４．７細胞でのクリシンおよび誘導体の細胞生存力効果はＭＴＳ分析によって観察された。上層液でＮＯの濃度はＬＰＳ処理後に増加し２４時間後に２５－１００μＭ濃度で化合物が細胞毒性を示しなかった（図１（Ｂ））。

【００６８】
図１はＲＡＷ２６４．７細胞でクリシンとその誘導体がＮＯ生成（Ａ）と細胞生存（Ｂ）に及ぼす影響を示す。＊印はＬＰＳ群に比べて有意な差を見せた（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）。提示されたデータは平均±標準誤差（ＳＥＭ）（ｎ＝３）である。

【００６９】
［実験例３：溶解度分析］
クリシンおよび誘導体を蒸留水に溶解させ溶解度を最大化するために１時間超音波処理して３７℃で培養した。超音波処理後、遠心分離（７０００ｇ、３７℃、５分）で溶解されていないサンプルを除去した。上層液をメタノールで希釈し０．４５μｍ１回用シリンジフィルター（Advantec, Dublin, CA, USA）でろ過しＨＰＬＣ分析を通してサンプルの濃度を分析した。

【００７０】
［実験例３の結果］
クリシン誘導体の溶解度を比較すると［表３］の通りである。

【００７１】

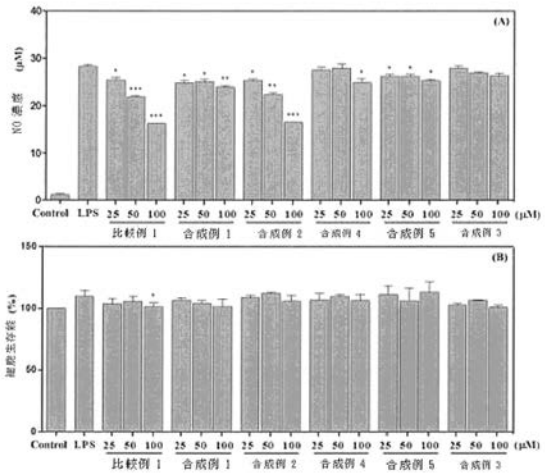
【表３】

区分	水への溶解度（ｍＭ、３７℃）	相対的溶解度
比較例１	0.030	1.00
合成例１	0.086	2.87
合成例２	0.265	8.83
陽性対照群	0.030	1.00

【００７２】

水への溶解度は、合成例１及び合成例２がそれぞれ０．０８６および０．２６５で、比較例１より２．８７倍、８．８３倍高かった。

【図１】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/001158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/353(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/353; A23L 33/00; A23L 33/10; A61K 31/122; A61K 31/35; A61K 31/37; A61K 9/00; A61P 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: chrysin derivative, diabetic complication, advanced glycation end products, pharmaceutical composition, pharmaceutical substances

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0002565 A (SUNTORY HOLDINGS LIMITED) 06 January 2017 See claims 1-5; paragraphs [0080]-[0084].	1-9
X	SHIN, J. -S. et al. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1999, vol. 9, pages 869-874 See abstract; page 873; table 1; formula 2.	1-9
X	SHIMADA, T. et al. Preventive effect of Kaempferia parviflora ethyl acetate extract and its major components polymethoxyflavonoid on metabolic diseases. Fitoterapia. 2011, vol. 82, pages 1272-1278 See abstract; pages 1272, 1276; figure 4.	1-9
X	WO 2008-008033 A1 (GLUCOX BIOTECH AB.) 17 January 2008 See claims 7-10; compound GLX 17.	1-9
A	KR 10-1742096 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 15 June 2017 See the entire document.	1-9
A	KR 10-1510257 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 09 April 2015 See the entire document.	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 APRIL 2019 (25.04.2019)	**25 APRIL 2019 (25.04.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/001158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0002565 A	06/01/2017	AU 2015-256997 A1	24/11/2016
		CA 2948127 A1	12/11/2015
		CN 106456597 A	22/02/2017
		JP 2015-227329 A	17/12/2015
		SG 10201808940 A	29/11/2018
		SG 11201609248 A	29/12/2016
		TW 201625574 A	16/07/2016
		US 2017-0071902 A1	16/03/2017
		WO 2015-170683 A1	12/11/2015
WO 2008-008033 A1	17/01/2008	EP 2046313 A1	15/04/2009
KR 10-1742096 B1	15/06/2017	None	
KR 10-1510257 B1	09/04/2015	None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/001158

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/353(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/353; A23L 33/00; A23L 33/10; A61K 31/122; A61K 31/35; A61K 31/37; A61K 9/00; A61P 3/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 크리신 유도체, 당뇨합병증, 최종당화산물, 약학 조성물, 약학적 제제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0002565 A (산토리 홀딩스 가부시키가이샤) 2017.01.06 청구항 1-5; 단락 [0080]-[0084] 참조.	1-9
X	SHIN, J. -S. 등, "Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9권, 페이지 869-874 초록; 페이지 873; 표 1; 도식 2 참조.	1-9
X	SHIMADA, T. 등, "Preventive effect of Kaempferia parviflora ethyl acetate extract and its major components polymethoxyflavonoid on metabolic diseases", Fitoterapia, 2011, 82권, 페이지 1272-1278 초록; 페이지 1272, 1276; 도면 4 참조.	1-9
X	WO 2008-008033 A1 (GLUCOX BIOTECH AB) 2008.01.17 청구항 7-10; 화합물 GLX 17 참조.	1-9
A	KR 10-1742096 B1 (한림대학교 산학협력단) 2017.06.15 전체 문헌 참조.	1-9
A	KR 10-1510257 B1 (한림대학교 산학협력단) 2015.04.09 전체 문헌 참조.	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 04월 25일 (25.04.2019)	2019년 04월 25일 (25.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/001158

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0002565 A	2017/01/06	AU 2015-256997 A1	2016/11/24
		CA 2948127 A1	2015/11/12
		CN 106456597 A	2017/02/22
		JP 2015-227329 A	2015/12/17
		SG 10201808940 A	2018/11/29
		SG 11201609248 A	2016/12/29
		TW 201625574 A	2016/07/16
		US 2017-0071902 A1	2017/03/16
		WO 2015-170683 A1	2015/11/12
WO 2008-008033 A1	2008/01/17	EP 2046313 A1	2009/04/15
KR 10-1742096 B1	2017/06/15	없음	
KR 10-1510257 B1	2015/04/09	없음	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/10	
Ａ６１Ｋ	*9/107*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/107	
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*27/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/12	
Ａ６１Ｐ	*17/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/02	

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(72)発明者　ファン、スン　ファン
大韓民国　１２２３９　キョンギード、ナミャンジュ－シ、ホンユルン－ロ　２４８ボン－ギル、４２、１０４－ドン　１１０３－ホ、（クムゴク－ドン、シンソン　プルンソル　アパートメント）
(72)発明者　イ、ス　ギョン
大韓民国　２４３２０　カンウォン－ド、チュンチョン－シ、ウソク－ロ　８５ボン－ギル、１、（ソクサ－ドン）
(72)発明者　チョ、グァン　レ
大韓民国　２４２５２　カンウォン－ド、チュンチョン－シ、ハルリムテハク－ギル、１、（オクチョン－ドン）
(72)発明者　クォン、ジョン　ハン
大韓民国　１０３５９　キョンギード、コヤン－シ、イルサンドン－グ、イルサン－ロ　４６３ボン－ギル、３３－１、２０１－ホ、（チョンバルサン－ドン）
(72)発明者　ハン、ジョン　ウ
大韓民国　１２９４７　キョンギード、ハナム－シ、ハナム－デロ　８０２ボン－ギル、１１１、３０６－ドン、１３０４－ホ、（シンジャン－ドン、エコタウン）
(72)発明者　ハン、ボク　ナム
大韓民国　２４３３６　カンウォン－ド、チュンチョン－シ、ミョンジュ－ギル、３－２、（ヒョジャ－ドン）
(72)発明者　イ、ジ　ヨン
大韓民国　１５５９１　キョンギード、アンサン－シ、サンノク－グ、ソッコ－ロ、２０４、１１０６－ホ、（サ－ドン、エリジウム）
(72)発明者　パク、キョン　ヒ
大韓民国　２４３９５　カンウォン－ド、チュンチョン－シ、チュンチョンスナン－ロ、４２、１０１－ドン、１５０４－ホ、（ソクサ－ドン、サミックセラミック　アパートメント）
(72)発明者　イ、ヒョン　ギョン
大韓民国　０５２３３　ソウル、カンドン－グ、コドク－ロ　６１－ギル、３４、８１０－ドン、２０１－ホ、（コドク－ドン、コドク　コンムウォン　アパートメント）
(72)発明者　サ、ユン　ジ
大韓民国　１１９３１　キョンギード、クリ－シ、ステクチョン－ロ、６０、１０２－ドン、１２

０３－ホ、（ステクードン）
(72)発明者　イ、ジ　ヒョン
大韓民国　０２５７５　ソウル、トンデムン－グ、ワンサン－ロ　２３－ギル、８９、１０２－ドン、１４０３－ホ、（チェギードン、イスブラウンストーン　アパートメント）

Ｆターム(参考) 4C076 AA17 AA22 AA30 AA36 AA53 BB01 CC21
4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 MA22 MA23 MA35 MA37 MA43
MA52 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA81 ZA89 ZC35 ZC41